

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720061152224

UDC _____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

肾细胞高渗胁迫保护的新机制——
甘油三酯的潜在作用

A Novel Mechanism for Renal Osmoregulation:
Potential Role of Triglycerides

邝俊韬

指导教师姓名: 杨云青 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2009 年 6 月 25 日

论文答辩时间: 2009 年 7 月 23 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 7 月

肾细胞高渗胁迫保护的新机制——甘油三酯的潜在作用

邝俊韬

指导教师: 杨云青

教授

厦门大学

目录

摘要.....	1
Abstract.....	2
第一章 前言.....	3
1. 高渗透压胁迫反应.....	5
2. 渗透调节的分子机制.....	10
3. 本文的研究目的和科学意义.....	19
第二章 材料与方法.....	20
1. 材料.....	20
2. 实验方法.....	23
第三章 结果与分析.....	31
1. mIMCD3 细胞在高渗胁迫下胞内中性脂质含量变化.....	31
2. 化学测定 mIMCD3 细胞中的总甘油三酯和总胆固醇含量.....	34
3. 高渗胁迫下 mIMCD3 细胞积累 TG 所需的脂肪酸来源.....	42
4. 高渗胁迫对 mIMCD3 细胞的一些脂质代谢相关基因的影响.....	47
5. mIMCD3 细胞在高渗胁迫下积累 TG 的保护作用.....	56
第四章 讨论.....	61
参考文献.....	66

Table of Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract	2
Chapter I Introduction	3
1 Hypertonic stress	5
2 Molecular mechanism of osmoregulation	10
3 Research purpose and novelties of thesis	19
Chapter II Materials and methods	20
1 Materials	20
2 Methods	23
Chapter III Results and analysis	31
1 Neutral lipid content in mIMCD3 cells under hypertonic stress	31
2 Hypertonic stress enhanced triglyceride accumulation in mIMCD3 cells	34
3 Origin of fatty acid contributed to TG synthesis in mIMCD3 cells under hypertonic stress	42
4 Effect of hypertonic stress on several lipid metabolic genes	47
5 Potential role of TG in hypertonic protection in mIMCD3 cells	56
Chapter IV Discussion	61
Reference	66

摘要

渗透调节是细胞的最基础生理活动之一。然而，细胞在高渗胁迫条件下的适应和保护机制仍然有很多未知的地方。

在本研究中，我们以 mIMCD3 细胞（小鼠肾内髓质收集管细胞）为模型，采用了 Oil Red O（油红）染色，化学测定和流式细胞等技术，初步探讨了高渗胁迫对肾细胞内脂质稳态的影响。我们发现，在 mIMCD3 细胞中，高渗胁迫处理（550-900 mOsmol/kg, NaCl）造成了胞内甘油三酯的积累增加，进而在胞内聚集大量脂滴。选用 ACC（乙酰辅酶 A 羧化酶）和 FASN（脂肪酸合酶）的化学抑制剂 TOFA 以及 Cerulenin 伴随 550 mOsmol/kg 高渗共处理 mIMCD3 细胞 24 h，可不同程度地降低高渗胁迫诱导的 TG 含量增加，并且可以造成该细胞在更高渗透压胁迫下（900 mOsmol/kg）存活率显著下降。这些结果提示我们，ACC 和 FASN 这两个脂肪酸合成的关键酶参与了高渗胁迫下 TG 积累增加的部分过程。同时，我们也证明了在 mIMCD3 细胞中，高渗胁迫诱导的 TG 积累增加是一种保护性的效应。

我们进一步通过 Western Blot 和半定量 RT-PCR 的方法测定了和脂质代谢相关的转录因子 SREBP1(固醇调控元件结合蛋白 1)，PPAR γ （过氧化物酶增殖体激活受体 γ ）的蛋白水平以及这两个转录因子的部分靶基因 mRNA 在高渗胁迫下的表达变化。出乎我们的意料，高渗 700 mOsmol/kg 处理 24 小时后，这些脂肪合成相关的重要转录因子蛋白和合成酶的 mRNA 表达水平与等渗对照组相比并没有明显的变化。这些结果可能提示，在高渗胁迫下 mIMCD3 细胞中的 TG 水平的提高可能不是在相应功能基因的转录水平进行加强，而是可能涉及转录后水平调控和蛋白翻译后修饰。

关键词：甘油三酯 脂滴 高渗胁迫

Abstract

Osmoregulation is one of the basic cellular physiological activities, but the regulatory mechanisms through which cells respond to hyperosmotic/hypertonic stresses remain to be completely elucidated.

We utilized Oil Red O staining, chemical measurement and flow cytometry to find that hypertonic stress enhance triglyceride (TG) accumulation and lipid droplet formation in mouse inner medulla collecting duct cells(mIMCD3). ACC inhibitor TOFA and FASN inhibitor Cerulenin were able to attenuate the enhanced TG content in mIMCD3 cells under 550 mOsmol/kg hypertonic stress, to different extent. So it implicates that fatty acids contribute to TG content increase may partilally derive from *de novo* synthesis. 900 mOsmol/kg hypertonic stress plus TOFA or Cerulenin treatment led to mIMCD3 cellular osmotic intolerance and significant cell death phenotype. So we had discovered a novel hyeprtonic osmoprotective behavior in mIMCD3 cells, and this metabolic change may exert an potential function in hypertonic adaptation of mIMCD3 cells.

Further, we assayed the protein expression of two transcription factors, SREBP1 and PPAR γ , both of which play important roles in lipid metabolism, under hypretonic stress, by Western Blot. We also determined the mRNA expression of several target genes mRNA of these two transcription factors with semi-quantitive RT-PCR. Unexpectedly, mRNA expression of SREBP1 targets, including ACC1, GPAT1 and ACL did not appear to be significantly affected by 700 mOsmol/kg hypertonic treatment for 24 h. PPAR γ target genes, such as ap2, CD36 and LPL showed an extreme low mRNA expression profile in mIMCD3 cells, even under 700 mOsmol/kg hypertonic stress. So we guess the enhanced TG accumulation and lipid droplets formation in mIMCD3 cells under hypertonic stress was possibily regulated by post-transcriptional, post-translational regulation or modification of the critical genes.

Keywords: Triglyceride Lipid droplet Hypertonic stress

第一章 前言

在日常生活中，我们对渗透现象的理解和对渗透原理的应用非常普遍。例如，临床上治疗中，病人需要输液时，对药物浓度要求非常严格。因为正常人体的血浆为等渗溶液（见后续描述），而 0.9%生理盐水也是一种等渗溶液，当使用 0.9%的生理盐水进行输液时，浓度大于或小于 0.9%，造成正常渗透压偏离，都会造成严重后果甚至导致病人死亡。因此，渗透压概念在医学上十分重要。

在物理学的概念描述中，渗透压的定义包含了以下内涵。将有浓度差异的溶液（假设为葡萄糖水溶液）分别置于 U 型管的两端中，在 U 型管中间放置一个半透膜，半透膜是一种具有特殊物理性质的膜，一般无生物活性，只允许小分子物质（例如，水分）通过，不允许大分子物质（例如，葡萄糖）通过，以隔开两边的溶液，水可以通过半透膜往溶液一端移动（图 1）；若于溶液端施加压力，而此压力可刚好可以阻止水的移动，则称此压力为渗透压（图 2）。渗透压的大小和溶液的重量摩尔浓度、溶液温度和溶质解离度相关。

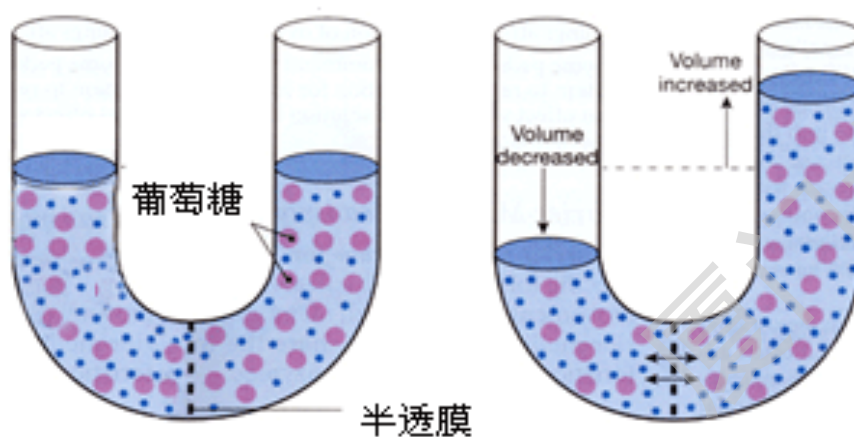


图 1 渗透现象^[1]

Fig.1 Osmotic phenomena

（红点：葡萄糖；蓝点：水分子）

溶液中能产生渗透效应的溶质粒子（分子、离子）统称为渗透活性物质。医学上常用渗透浓度来间接表示溶液渗透压的大小，它定义为渗透活性物质的量除以溶液的体积，单位为渗透摩尔每升（Osmol/L 或 Osmol/kg H₂O）或毫渗透摩尔每升（mOsmol/L 或 mOsmol/kg H₂O）。它也反映了每升溶液中所含渗透活性物质的总质点数。

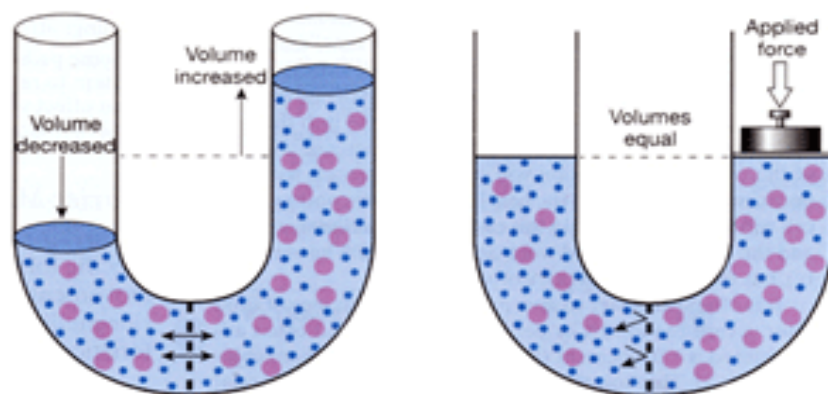


图 2 渗透压示意图^[1]

Fig.2 Osmotic pressure

（红点：葡萄糖；蓝点：水分子）

渗透浓度可根据物质的量或浓度来计算，计算过程中还应将非电解质和电解质加以区别。例如，0.1mol/L C₁₂H₂₂O₁₁ 的渗透浓度为 0.1 Osmol/L 或 100 mOsmol/L，而 0.1mol/L NaCl 的渗透浓度为 0.2 Osmol/L 或 200 mOsmol/L。临床上规定：渗透浓度在 280-320 mOsmol/L 范围的溶液为等渗溶液；渗透浓度小于 280 mOsmol/L 的溶液为低渗溶液；渗透浓度大于 320 mOsmol/L 的溶液为高渗溶液。

在血浆中，血浆渗透压由晶体渗透压和胶体渗透压组成，晶体物质不能自由通过细胞膜，但可以自由通过有孔的毛细血管。蛋白质等大分子胶体物质不能通过毛细血管，因此，胶体渗透压决定血管内外两侧水的平衡，晶体渗透压仅决定细胞膜两侧水份的转移。

几乎所有生物体的细胞都存活于溶液环境中，而且绝大多数细胞都处于等渗溶液环境中。溶液渗透压可随生物体的生理变化而改变，所以细胞面对胞外溶液环境渗透压的变化是一种基本的生理胁迫，即渗透胁迫（Osmotic stress）。

渗透胁迫分为两种，即高渗胁迫（Hypertonic/hyperosmotic stress）和低渗胁迫（Hypotonic/hypo osmotic stress）。高渗胁迫即胞外环境的渗透压高于胞内溶液环境，高渗环境能使细胞在短时间内水分丢失外流，细胞皱缩；低渗胁迫则相反，可以使细胞从外环境吸收水分，细胞溶胀。细胞在外环境渗透压变化的情况下进行自我调整以适应存活的行为就是细胞的渗透调节反应。细胞渗透调节可以说是生物学研究中最为基础和重要的研究领域之一。

在动物细胞中，渗透调节的具体机制仍然具有很大的未知性，调节的过程以及分子机制、生理意义仍有待深入研究。在哺乳动物细胞中，关于高渗胁迫方面的研究已经开展得比较多，本前言主要就这个领域已有的研究和成果作一简要综述。

1. 高渗透压胁迫反应

1.1 造成高渗胁迫的溶质

盐类，有机物（葡萄糖，山梨醇，甘露醇等等）都能对细胞造成高渗胁迫。在体外细胞模型的建立和研究中发现，上述这些物质造成的高渗胁迫反应和机制有其相似之处。例如，NaCl，甘露醇以及蔗糖等造成的高渗透压都能在mIMCD3（mouse inner medullary collecting duct cells，小鼠肾内髓质收集管细胞）中激活MUPP1（multi-PDZ protein-1，一种13-PDZ domain-containing adaptor protein）和Nup88（nucleoporin 88，核孔素88）^[2, 3]。但也有部分研究发现，渗透胁迫反应特异性可能是渗透溶质类型决定的。例如在心肌细胞中，相同浓度的山梨醇和甘露醇造成的高渗胁迫激活的信号和生理反应途径差异决定了是否诱导心肌细胞凋亡（表1）^[4]。这预示着高渗胁迫是一种复杂的胁迫反应。

表1 心肌细胞中不同高渗透溶质造成的细胞反应^[4]

Different cellular events triggered by hyperosmotic solutions of sorbitol and mannitol in cultured cardiac myocytes

Parameter	Sorbitol	Mannitol
Cell volume decrease	+++	+++
Stress-activated pathways		
ERKs	++	+/-
p38-MAPK	+	+
p54-JNK	+++	++
p46-JNK	+	++
PKB	+	-
Hexose uptake stimulation	+++	+++
GSH depletion	+++	-
Polyol pathway		
Aldose reductase protein increase	+++	-
Aldose reductase activity increase	+++	-
Sorbitol dehydrogenase protein	++	-
Intracellular sorbitol increase	+++	-
Apoptosis		
Bcl-xL decrease	++	-
DNA fragmentation	+++	-

虽然 NaCl 在机体内是决定胞外液体渗透压的主要溶质,但体外细胞培养的实验表明,高浓度 NaCl 溶液环境中的细胞效应并不一定都是由溶液高渗透压造成的,NaCl 本身电离出来的 Na^+ 和 Cl^- 可能会造成不同的细胞效应。例如,高浓度的 NaCl 能诱导 mIMCD3 细胞中 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ γ 亚基的表达大幅度增加,但向培养基中添加醋酸钠 (Sodium Acetate) 达到相同的高渗透压值并不能诱导 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ γ 亚基的表达增加,而 Capasso 等人进一步证明了 Cl^- 的存在是高浓度 NaCl 诱导 mIMCD3 细胞中 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ γ 亚基表达增加的必要因素^[5]。这个结果表明了在上述这种细胞效应中,高渗透压因素是次要的。

因此,为了证明某种可能由高渗胁迫引起的细胞效应或现象,一般需要选择需要选择两种性质的溶质来造成对细胞的高渗胁迫:一种是离子型的溶质,如 NaCl,醋酸钠,氯化胆碱等等,这些物质均能释放电离离子,细胞膜对其通透;另外一种是有有机型溶质,如山梨醇,甘露醇 (Mannitol),棉子糖 (Raffinose),蔗糖 (Sucrose) 等等,这些物质极难穿透细胞膜^[2, 6]。上述两种类型物质都可以造成溶液的高渗透压 (Hyperosmolality),对细胞形成造成高渗胁迫 (Hypertonic/Hyperosmotic stress)。值得提出的一点是,Hyperosmotic stress 和 Hypertonic stress 这两个概念在中文语言中,大多数时候可以通用,泛指高渗胁迫。但有一种情况,例如,尿素这种溶质比较特殊,虽然添加相应浓度的尿素也能造成溶液的高渗透压,但尿素可以穿透细胞膜,因此,它不被视为具有造成高渗胁迫 (Hypertonic stress) 的能力^[7]。

1.2 几种组织中的细胞渗透调节

1.2.1 肾

肾脏具有三大方面的生理功能：第一方面是排泄机体代谢废物，是体内重要排泄器官，为维持内环境发挥着重要作用，这是通过尿液生成代谢终产物，机体多余物质随尿液排出来完成；第二方面，肾脏有调节水、电解质、酸碱平衡作用。肾脏对水分的调节，依赖于抗利尿激素（AntidiureticHormone, ADH）作用。而对 Na^+ 、 K^+ 离子调节受醛固酮（Aldosterone）影响；第三方面，肾脏有内分泌功能，可以分泌激素类活性物质，如肾素、缓激肽、前列腺素、促红细胞生成素等等。总之，肾脏的排泄及调节电解质，体液平衡的功能，均是通过尿液的生成和排出实现的。

肾脏对尿液的浓缩功能(水分的重吸收)是通过特殊的“逆流倍增”系统实现的。由于髓袢（也叫亨氏袢，Loop of Henle）、其它肾小管区域（Tubules）以及直小血管（Vasa recta）解剖上特殊的“U”型排列，肾小管各段对水， NaCl 以及尿素等通透情况不同，以及髓袢上升支粗段（Thick ascending limb of Loop of Henle）对 NaCl 的主动重吸收等因素，造成髓质间质从外髓质（Outer medulla）向内髓质（Inner medulla）渗透梯度逐渐增加，逆流交换使该梯度得以建立和维持（图3）。

除了高浓度的 NaCl 外，肾内髓质细胞还要承受高浓度尿素的影响，高浓度尿素能使胞内蛋白质等大分子变性。体外培养的细胞实验证明，高浓度尿素和 NaCl 能造成相似的细胞效应，并且可能互相影响^[7]。

从小鼠或大鼠内髓质（Inner medulla）分离出来的收集管上皮细胞成为研究细胞渗透调节最好和最普遍的模式细胞之一^[8-11]。



图3 肾髓质渗透压梯度^[12]

(1, 2, 3, 4: 以皮质区渗透压为基数 1, 髓质区渗透压由外向内成倍增长)

Fig. 3 Osmotic gradient in renal medulla.

1.2.2 脑

脑部组织间隙和脑脊髓液渗透压在正常生理情况下和血浆渗透压是平衡一致的。在某些病理情况下如神经紊乱性疾病, 血浆渗透压下降或上升会导致脑水肿或细胞收缩, 最终导致脑部细胞功能失常。通过原位杂交技术 (ISH, *in situ* hybridization) 发现, 肾脏内髓质涉及渗透调节的基因在大鼠脑部部分区域的细胞 (如神经元细胞) 受系统性高渗透压影响时被诱导表达, 同时也引发出关于渗透调节分子机制的细胞特异性的问题^[13]。

1.2.3 胸腺和脾脏淋巴细胞

以往的研究观点认为, 机体在正常生理情况下各种组织中的渗透压 (肾脏除外) 应该与血浆渗透压是一致的。但最新的研究测定, C57BL/6小鼠部分组织的渗透压在正常生理条件下是略高于血清或血浆渗透压的 (图4)。

如图4显示, 在脾脏和胸腺这两个免疫器官中的组织渗透压在正常情况下都

高于血清渗透压。这种差异存在的意义和机制大部分仍是未知的。

Junger等人曾经发现在体外高渗（25 mM Na⁺浓度）培养的T细胞增殖速度加快了两倍，提示着体内组织、血浆渗透压和免疫细胞功能可能密切相关^[14]。高浓度KI或NaCl培养人外周血单核细胞（PBMC, peripheral blood mononuclear cell）可加强IL8（白介素8）的合成能力，并且由p38信号途径介导^[15]。

2004年发表在PNAS的一篇文章阐述了NFAT5/TonEBP/OREBP（Nuclear factor of activated T cell 5/Tonicity enhancer binding protein/Osmotic response element binding protein）在免疫细胞中的作用。TonEBP是目前真核生物中唯一研究得较清楚的控制渗透胁迫反应的转录因子。通过 *NFAT5* 敲除小鼠模型和体外 *NFAT5* 缺失的细胞模型的研究发现，NFAT5部分或完全缺失不仅导致T淋巴细胞在高渗环境中的增殖能力下降，而且杂合子敲除小鼠抗原特异性免疫反应下降。该文章的数据表明，淋巴细胞介导的免疫反应与细胞所处的微环境渗透压可能是密切联系的，NFAT5介导的渗透调节反应扮演着重要角色^[16]。

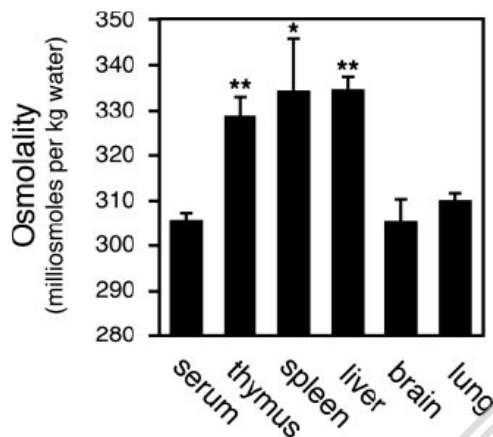


图4 正常C57BL/6小鼠部分组织渗透压测定^[16]

Fig.4 Several tissues and serum osmolality measurement in normal C57BL/6 mice.

1.2.4 肝

据以往的观点认为，肝脏与除肾脏外的其他器官一样，肝组织细胞所处的渗透压环境与血浆渗透压是保持一致的。但最新的研究和测定表明（图4），肝组织的渗透压在正常生理条件下已经高于血清渗透压，其生理意义仍然不太清楚。

Häussinger等人1993年在Lancet发表文章^[17]提出，机体细胞的水化（Hydration）状态，离子的活力与质膜的底物运输系统（Substrate transport systems）相关，肝细胞的水化状态可以在几分钟内受激素，底物水平和氧化胁迫程度影响，进而调节细胞的体积变化。该研究组在人体内的实验证明，肝细胞在水化和缺水

（Dehydration）状态下，胞内物质的代谢呈现相反方向：在高渗（限制饮水或静脉注射高浓度NaCl造成）状态下，肝细胞体积皱缩，胞内蛋白和肝糖原降解，糖酵解循环加强；而在低渗透压状态下，肝细胞抑制蛋白和肝糖原降解^[18]。

另外，体外培养的Chang liver肝细胞也具有和肾内髓质收集管细胞类似的高渗调节反应。高浓度NaCl能促使细胞内醛糖还原酶（Aldose reductase, AR）的mRNA表达增加^[19]。由于肝脏是体内最主要的代谢清除分解异生物物质（Xenobiotics）——如药物，杀虫剂，致癌物等等的器官，肝脏组织渗透压的变化可能与异生物物质代谢的过程密切相关。2007年Takashi Ito等人发现，分离人原代肝细胞体外培养，在培养基中添加高浓度NaCl或蔗糖造成高渗胁迫，通过微阵列分析（Microarray）和实时定量PCR实验检测到细胞色素P450超家族成员（其中CYP1,CYP2,CYP3家族都与Xenobiotics代谢密切联系）*CYP2E1*，*CYP2A1* mRNA受高渗胁迫诱导表达。其中*CYP2E1*的诱导表达受NFAT5/TonEBP/OREBP转录因子调控^[20]，上述这项研究成果表明TonEBP介导的渗透调节途径在肝脏Xenobiotics代谢中可能发挥了重要作用。

2. 渗透调节的分子机制

细胞承受高渗胁迫时，可激活一些非常独特的信号途径以调控渗透保护反应或凋亡反应。

2.1 HOG 和 MAPK 激酶途径——渗透感应系统

细胞外环境渗透压的改变，会激活一系列的保护反应，而这些保护反应的时空分布是程序性的，从胞外到胞内，受严格的信号通路调控。

在低等生物中，如酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）的高渗透压调节反应信号通路已经被研究得比较清楚（图5），就是High osmolarity glycerol -MAPK pathway（HOG -MAPK）。Sho1和Sln1是一种跨膜蛋白，是高渗透压环境的初始

感应者 (Osmosensors), Sho1和Sln1介导的信号通路可以分别激活各自的复合体途径, 最终都可以激活HOG1, 一种酵母中的MAPK (Mitogen activated protein kinase), 进而驱动酵母中合成甘油的转录因子和相关合成酶的表达。甘油是酵母耐受高渗环境时, 胞内合成的最主要的保护性渗透溶质 (Osmolyte) (渗透溶质作用简介参考2.3)。

而在哺乳动物细胞中, 具有和酵母类似的渗透感应途径—Rac-OSM-MEKK3-MKK3 pathway, 其中Rac是一种GTP酶, OSM作为一种骨架蛋白(Scaffold)(图6)。与酵母中Sln1-HOG1或Sho1-HOG1途径类似, Rac-OSM-MEKK3-MKK3整个复合体参与p38 MAPK的激活^[21], 哺乳动物中的p38是酵母中HOG1的类似物 (Analogue)。p38 - MAPK途径是介导细胞在胁迫条件下存活的最重要的信号通路之一, 细胞在高渗透压环境下, 会激活包括p38 MAPK途径在内的一些信号通路, 从而诱导渗透胁迫保护基因的表达。

从酵母到哺乳动物细胞, 存在保守的, 相似的高渗胁迫反应元件构成和分子机制, 在酵母细胞的渗透调节研究中获得的成果或许会有利于发现高等生物细胞渗透调节的新机制, 从而获取更深入和全面的认识。

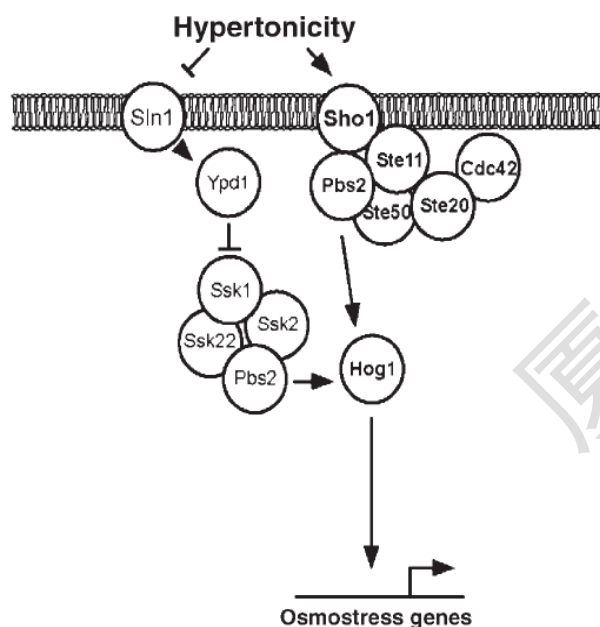


图5 酵母HOG MAPK途径^[22]

(—|: 负向调控; —→: 正向调控)

Fig.5 HOG-MAPK pathway in yeast.

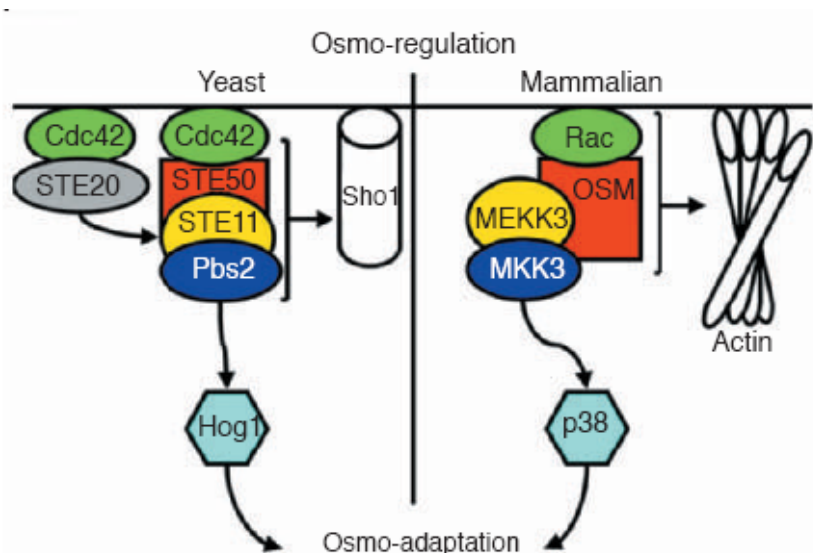


图6 酵母和哺乳动物细胞基础渗透调节信号通路的比较^[23]

(\longrightarrow : 正向调控)

Fig.6 Comparison of basic osmotic signal pathway in yeast and mammalian cells.

2.2 高渗胁迫对细胞的影响——细胞周期调控和凋亡效应

1) 细胞周期停滞效应 (Cell cycle arrest)

培养基中NaCl或尿素 (Urea) 浓度的急剧上升会导致处于不同细胞周期的mIMCD3细胞周期停滞，G1期细胞不启动DNA复制，S期细胞停止DNA复制，G2期细胞停止分裂，停滞期时间由NaCl或Urea浓度决定。细胞渡过停滞期后，细胞仍可进行分裂，分裂速度与培养基渗透压值有关^[24]。在细胞周期的停滞期中，细胞可诱导渗透性保护基因的表达，积累保护性渗透溶质。

2) DNA断裂效应

各种胁迫条件，包括ROS，紫外照射， γ 射线暴露以及高渗胁迫等等都能造成DNA断裂 (DNA break)。DNA断裂是细胞凋亡的早期特征，DNA可断裂形成200-250 kb 或 30-35 kb 的大片段，晚期则可进一步在核小体间断裂，形成180-200 bp 的 DNA断裂片段。高渗胁迫下的细胞DNA断裂效应与其他胁迫条件下的细胞DNA断裂效应相比，机制有所不同。

在紫外照射， γ 射线暴露等胁迫条件下造成的细胞DNA断裂可诱导Chk1磷酸化，从而使细胞周期停滞^[25]，但高浓度NaCl处理mIMCD3细胞并不会使Chk1磷酸化，证明了mIMCD3细胞受高渗胁迫诱导的细胞周期停滞是Chk1磷酸化非依赖

性的。更深入的研究证明高渗处理后的mIMCD3细胞再加以UV或射线暴露，可阻止后者诱导的Chk1磷酸化^[26]。

令人惊讶的是，高渗胁迫下存活的细胞可允许DNA断裂的存在。无论是在体外培养的mIMCD3细胞还是体内肾内髓质中，高渗胁迫抑制DNA修复^[27]。

这些研究预示着高渗胁迫与其他胁迫条件相比较，可能拥有较为特殊的细胞效应。

3) 细胞凋亡

不同的细胞可耐受不同程度的高渗透压，一旦超过耐受上限，细胞会启动程序性死亡——凋亡（Apoptosis）^[28, 29]。现已知的两种细胞凋亡途径，分别为细胞内（线粒体）和细胞外（死亡受体，Death receptor）途径^[30]。

研究表明，高渗所造成的细胞凋亡途径可因细胞类型而异。例如，高山梨醇（达900 mOsmol/kg）急剧处理HeLa细胞导致肿瘤坏死因子 α 受体（TNF α receptor）集簇和内在化（Clustering and internalization）^[31]。高浓度NaCl处理巨噬细胞系U937和B淋巴细胞系LCL721可诱导TNF α 合成和分泌，向培养基中添加TNF α 中和抗体，可抑制高浓度NaCl造成的U937细胞凋亡，但并不阻止LCL721细胞凋亡。证明了高渗诱导细胞凋亡途径的多样性。

另外，当mIMCD3细胞急剧承受高达700 mOsmol/kg 高渗胁迫时，线粒体迅速去极化（Depolarization），线粒体Bcl2/Bax比例降低，胞内ADP/ATP比例上升，但细胞线粒体并不释放细胞色素c（Cytochrome c）^[9]。因此我们推测mIMCD3细胞受急剧高渗胁迫（600-700 mOsmol/kg）诱导的凋亡（Caspase途径）是Cytochrome c非依赖性的，而Cytochrome c非依赖性的Caspase激活途径确实存在^[32]。

4) 氧化胁迫（Oxidative Stress）

胞外NaCl或Urea浓度的上升可以引起活性氧分子（Reactive oxygen species, ROS）的增加^[33-35]。一般来说，ROS对于细胞具有破坏性，但在高渗胁迫反应中，ROS可作为渗透保护反应的一个信号分子。ROS参与激活TonEBP转录因子及其靶基因的表达^[35]。ROS还参与ERK-MAPK和p38-MAPK途径的激活，并介导高渗状态下COX2蛋白表达的增加^[33]。TonEBP和COX2介导的渗透胁迫信号通路均是已知的经典的高渗胁迫保护途径。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕